

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 23/02/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DA MEMBRANA CELLFATE®, ASSOCIADA À ADIÇÃO DE MELATONINA
NO MEIO DE CULTIVO, NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

ADRIANO FELIPE MENDES

Médico veterinário

Botucatu, SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

**EFEITOS DA MEMBRANA CELLFATE®, ASSOCIADA À ADIÇÃO DE MELATONINA
NO MEIO DE CULTIVO, NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

ADRIANO FELIPE MENDES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan
Membrive

Botucatu, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Mendes, Adriano Felipe.

Efeitos da membrana CellFate®, associada à adição de melatonina no meio de cultivo, na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Adriano Felipe Mendes.
- Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudia Maria Bertan Membrive
Capes: 50504002

1. Antioxidantes. 2. Embrião. 3. Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos. 4. Bovinos - Reprodução.

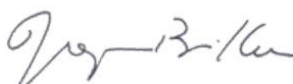
Palavras-chave: Antioxidante; Cultura tridimensional; Embrião; Oócito; Reprodução.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELATONINA NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E/OU CULTIVO EMBRIONÁRIO SOBRE AS TAXAS DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO” (EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MELATONIN ON OOCYTE MATURATION AND/OR EMBRYO CULTURE ON IN VITRO CULTURED BOVINE EMBRYO PRODUCTION RATES) registrada com o nº **06/2021 - CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **11/06/2021**.

Dracena, 14 de junho de 2021.



Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

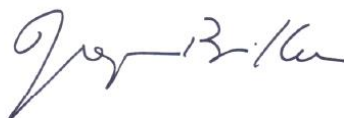
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br- academico@dracena.unesp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeitos do sistema tridimensional e da melatonina no cultivo in vitro de embriões bovinos"** (Effects of the three-dimensional system and melatonin in the in vitro culture of bovine embryos), registrada com o nº 14/2022.R2 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **21/07/2022**.

Dracena, 21 de julho de 2022.



Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

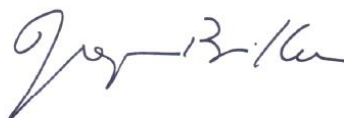
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeitos do sistema tridimensional e da melatonina no cultivo in vitro de oócitos bovinos"** (Effects of the three-dimensional system and melatonin on in vitro culture of bovine oocytes), registrada com o nº 15/2022.R2 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **21/07/2022**.

Dracena, 21 de julho de 2022.



Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

Autor: Adriano Felipe Mendes

Título: Efeitos da membrana Cellfate®, associada à adição de melatonina no meio de cultivo, na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Banca avaliadora

Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Presidente e orientadora

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Dracena, SP

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro titular

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Membro titular

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

Membro Titular

Universidade de São Paulo - USP, Pirassununga, SP

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger

Membro titular

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP

Data: 23/02/2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, especialmente minha mãe Elza; minhas irmãs Andréia e Adriana; e amiga Jacqueline. Consegui chegar a esta defesa de tese de Doutorado porque estive rodeado de amor. Tive o privilégio de caminhar pelo mundo acompanhado de pessoas especiais. No início desse caminho fui acompanhado de perto por minha mãe, minhas irmãs e meu irmão, e, mais a frente, por uma pessoa que hoje também é família, Jacqueline que proporcionou uma amizade que nasceu, cresceu e floresceu, um amor que pode ser difícil de explicar no ocidente, mas que, há séculos, encontra definição em uma lenda do oriente “*Unmei no akai ito*” onde duas pessoas estão ligadas por um fio vermelho invisível e as circunstâncias da vida as levariam a um encontro, independente do tempo e distância. Amo vocês, família. Ao meu irmão André, alguém que amei e que me amou de volta, uma pessoa especial que participou também da minha caminhada, infelizmente por um período finito. Hoje ele não está mais presente, mas suas lembranças seguirão comigo para sempre na forma de amor convertido em saudade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia e seus docentes, ao Instituto de Biociências e a Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu/SP, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2022/01110-3), pelo auxílio financeiro ao referido projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação exclusiva ao Doutorado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, pela orientação que construiu meu crescimento como pesquisador durante os anos em que estivemos juntos no desenvolvimento dos estudos que compuseram esta tese.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo - USP,

especialmente à Dra. Isabella Rio Feltrin, pelo auxílio nas análises de RT-qPCR e pela disposição em me auxiliar nas análises estatísticas dos dados.

Ao Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, responsável pelo LFEM, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, pelo incondicional apoio científico.

A Profa. Dra. Angela Gonella-Diaza, da Universidade da Flórida, pela contribuição científica na avaliação dos dados obtidos.

A Dra. Janice Koepp que, à frente da Biocelltis Biotecnologias S.A., cedeu as matrizes CellFate®, imprescindíveis para o estudo desenvolvido. Agradeço também aos demais colaboradores da Biocelltis Biotecnologias S.A. envolvidos indireta ou diretamente no projeto.

Aos membros titulares da comissão avaliadora Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim da Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu/SP; Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP, Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira da Universidade de São Paulo – USP de Pirassununga/SP e Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP, que aceitaram o convite para participar deste momento tão importante. Obrigado por toda contribuição pessoal e científica.

Aos membros do Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião - LIFE, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT da Universidade Estadual Paulista - UNESP de Dracena/SP, em especial à Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado; Ms. Valeska de Castro Lourenço; aos mestrandos Lucas de Oliveira Bezerra e Laura Chuba Machado Rolniche; aos alunos de Iniciação Científica Ana Laura Silva, Maria Eduarda Rocha Pinto, Emily Silva do Nascimento, Gabriel Souza da Silva e Catarina Lazarevicius Prestes.

Ao médico veterinário, Lucas Henrique Gaspar, que junto ao frigorífico ACOVACAT e seus colaboradores, não mediu esforços para garantir a disponibilidade dos ovários que serviram de base para as pesquisas desenvolvidas.

Aos amigos que encontrei em Dracena/SP, e deixo aqui um agradecimento especial aos amigos do “*Massacre do coco elétrico*”, grupo que agora também faço parte.

Aos professores e funcionários técnico-administrativos da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT de Dracena/SP, por todo o suporte oferecido.

A todas as pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo.

A todos, minha enorme gratidão!

RESUMO

A hipótese é que a utilização do sistema de cultivo tridimensional (3D) com o emprego de uma membrana de nanocelulose bacteriana (CellFate®; Biocelltis S.A., Brasil), durante a maturação oocitária (MIV) e cultivo embrionário (CIV) associada à adição de melatonina na MIV, aumenta a produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, esta tese foi construída em três capítulos: revisão de literatura (Capítulo 1); efeito dose-resposta da melatonina adicionada durante a MIV e/ou CIV no sistema de cultivo convencional (bidimensional, 2D) na produção e qualidade embrionária (Capítulo 2; Estudo 1) e associação do cultivo 3D (CellFate®) na MIV e CIV, com a adição de 10 μ M (10000 nM) de melatonina na MIV sobre a produção e qualidade embrionária (Capítulo 3; Estudo 2). No estudo 1, objetivou-se avaliar os efeitos de 0,01, 10 e 10000 nM de melatonina (Sigma Aldrich, M5250), durante a MIV (Experimento 1), CIV (Experimento 2) e MIV e CIV (Experimento 3). Dessa forma, ovários de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram coletados em abatedouro e oócitos derivados desses ovários foram submetidos à MIV por 24 horas em meio próprio acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), além dos tratamentos. A seguir, oócitos e espermatozoides foram co-cultivados por 18 horas. Os prováveis zigotos foram transferidos para o meio fluido sintético de oviduto acrescido com 2,5% de SFB, além dos tratamentos, onde foram cultivados por 9 dias. Todas as etapas foram realizadas gotas de cultivo submersas em óleo mineral para cultivo dispostas em placas de Petri em incubadora a 38,5°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram avaliadas aos 3, 7 e 9 dias de cultivo, considerando a FIV como dia 0 (D0). Aos 9 dias, blastocistos eclodidos foram colhidos para avaliar a expressão de OCT4 (*POU class 5 homeobox 1*), SOD2 (*superoxide dismutase 2*), GPX1 (*glutathione peroxidase 1*), e BAX (*BCL2 associated X*) por RT-qPCR. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida da aplicação de contrastes. A taxa de clivagem não foi alterada nos três experimentos. No Experimento 1, o uso de melatonina no D7 determinou uma tendência para maior número de blastocistos eclodidos ($P = 0,0686$) e totais ($P =$

0,0892) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. No D9, observou-se maior número de blastocistos totais ($P = 0,0216$) no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM e uma tendência ($P = 0,0741$) de maior número de blastocistos eclodidos no grupo 10000 nM comparado ao grupo 0,01 nM. Não foram observadas diferenças para a RT-qPCR. Nos experimentos 2 e 3 não foram observadas diferenças significativas na produção embrionária. Em conclusão, a adição com melatonina apenas na MIV determina uma tendência para melhores taxas de produção embrionária quando 10000 nM foi comparado a 0,01 nM e que tal adição não alterou a expressão dos transcritos OCT4, SOD2, GPX1 e BAX. No estudo 2, objetivou-se avaliar o efeito do sistema 3D na MIV, CIV ou MIV e CIV, bem como o impacto de 10 μ M de melatonina na MIV na presença ou não do sistema 3D durante a MIV. Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* $\times$ *Bos taurus taurus* foram colhidos em abatedouro para a recuperação oocitária. As etapas de MIV, FIV e CIV, bem como as análises seguiram o protocolo descrito para o Estudo 1, exceto que todas as etapas foram realizadas placas de 4 poços. O sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de clivagem em D3 comparado ao controle ($P = 0,0300$) e ao sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0313$). No D7, o sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de blastocisto inicial comparado ao controle ($P = 0,0079$). No D9, o sistema 3D com melatonina apresentou maior taxa de blastocisto expandido comparado ao sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0491$), maior taxa de blastocisto geral comparado aos grupos controle ($P = 0,0160$) e sistema 3D sem melatonina ($P = 0,0193$). A utilização do sistema 3D isolado na MIV resultou em taxa de blastocisto geral semelhante ao sistema 3D com melatonina, sendo esses dois sistemas superiores aos sistemas 3D sem melatonina, 3D somente no CIV e controle ($P = 0,0323$). Em conclusão, o sistema 3D com ou sem melatonina, resulta em maior taxa de blastocisto geral no D9, sem alterar a expressão de OCT4, GPX1, SOD2 e BAX em embriões bovinos. Com base nos dois estudos, conclui-se que a utilização de 10 μ M, bem como a utilização do sistema 3D CellFate® melhoram produção embrionária *in vitro*.

Palavras-chave: reprodução, oócito, embrião, antioxidante, cultura tridimensional.

ABSTRACT

The possibility is that the use of the three-dimensional (3D) culture system, with the use of a bacterial nanocellulose membrane (CellFate®), during *in vitro* oocyte maturation (IVM) and *in vitro* embryonic culture (IVC) associated with the addition melatonin in OM increases the production and quality of bovine embryos produced *in vitro*. To achieve this, this thesis was constructed in three chapters: literature review (Chapter 1); dose-response effect of melatonin added during IVM and/or IVC in the conventional culture system (two-dimensional, 2D) on embryonic production and quality (Chapter 2; Study 1) and association of 3D culture (CellFate®) in IVM and IVC, with the addition of 10 μ M (10000 nM) of melatonin in IVM on embryonic production and quality (Chapter 3; Study 2). In study 1, the objective was to evaluate the effects of 0.01, 10 and 10000 nM of melatonin (Sigma Aldrich, M5250), during IVM (Experiment 1), IVC (Experiment 2) and IVM and IVC (Experiment 3). Thus, ovaries from Nellore females (*Bos taurus indicus*) were collected in a slaughterhouse and oocytes derived from these ovaries were subjected to IVM 24 hours in specific medium with 10% fetal bovine serum (FBS), in addition to the treatments. Next, oocytes and sperm are formed co-cultured 18 hours. The probable zygotes were transferred to the synthetic fluid oviduct medium added with 2.5% FBS, in addition to the treatments, where they were cultured for 9 days. All stages were carried out in drops of cultivation submerged in oil for interested cultivation in Petri dishes in an incubator at 38.5°C and a humid atmosphere with 5% CO₂. Cleavage, blastocyst and hatching rates were evaluated at 3, 7 and 9 days of culture, respectively, considering IVF as day 0 (D0). At 9 days, hatched blastocysts were collected to evaluate the expression of OCT4 (POU class 5 homeobox 1), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1), and BAX (BCL2 associated X) by RT-qPCR. The data were subjected to analysis of variance followed by the application of contrasts. The cleavage rate was not changed in the three experiments. In Experiment 1, the use of melatonin determined on D7, a tendency for a greater number of hatched ($P = 0.0686$) and total ($P = 0.0892$) blastocysts in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group. On D9,

we encouraged a greater number of total blastocysts ($P = 0.0216$) in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group and a tendency ($P = 0.0741$) for a greater number of blastocysts hatched in the 10000 nM group compared to the 0.01 nM group. No differences were observed for RT-qPCR. In experiments 2 and 3, no important differences in embryo production were observed. In conclusion, the addition of melatonin only to IVM determines a trend towards better embryonic production rates when 10000 nM was compared to 0.01 nM and that such addition did not alter the expression of OCT4, SOD2, GPX1 and BAX transcripts. In study 2, the aim was to evaluate the effect of the 3D system on IVM, IVC or IVM and IVC, as well as the impact of 10 μ M melatonin on IVM in the presence or absence of the 3D system during an IVM. Ovaries from *Bos taurus indicus* $\times$ *Bos taurus taurus* females were collected in a slaughterhouse for oocyte recovery. The IVM, IVF and IVC steps, as well as the analyzes followed the protocol described for Study 1, except that all steps were performed in 4-well plates. The IVM, IVF and IVC steps, as well as the analyzes followed the protocol described for Study 1. The 3D system with melatonin showed higher cleavage rates in D3 compared to control ($P = 0.0300$) and to the 3D system without melatonin ($P = 0.0313$). On D7, the 3D system with melatonin showed higher early blastocyst rates compared to the control ($P = 0.0079$). On D9, the 3D system with melatonin showed higher expanded blastocyst rates compared to the 3D system without melatonin ($P = 0.0491$), higher overall blastocyst rates compared to the control ($P = 0.0160$) and 3D system without melatonin groups. melatonin ($P = 0.0193$). The use of the 3D system alone in IVM resulted in an overall blastocyst rate similar to the 3D system with melatonin, with these two systems being superior to the 3D systems without melatonin, 3D only in IVC and control ($P = 0.0323$). In conclusion, the 3D system with or without melatonin results in higher overall blastocyst rates at D9, without altering the expression of OCT4, GPX1, SOD2 and BAX in bovine embryos. Based on our two studies, in conclusion, the use of 10 μ M as well as the use of the 3D CellFate® system improves *in vitro* embryo production.

Keywords: reproduction, oocyte, embryo, antioxidant, three-dimensional culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	20
2.2.ESTRESSE OXIDATIVO EM OÓCITOS E EMBRIÕES DURANTE A PIVE.....	21
2.3.PROPRIEDADES BENÉFICAS DA MELATONINA.....	23
2.4.EFEITOS DA MELATONINA EM COMPLEXOS <i>CUMULUS</i> -OÓCITO E EMBRIÕES.....	24
2.5.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAL.....	30
2.6.SISTEMAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAIS BASEADOS EM MATRIZES DE NANOCELULOSE BACTERIANA.....	31
2.7.HIPÓTESE.....	32
2.8.OBJETIVOS.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 2: ESTUDO 1.....	56
CAPÍTULO 3: ESTUDO 2.....	107

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma proporcional ao aumento da população. O Brasil possui alta representatividade quando se trata da atual e futura produção de alimentos. Em busca de alcançar o máximo de êxito no que se refere aos 17 objetivos preconizados pela Organização das Nações Unidas (ONU) até 2030, especialmente "Fome Zero, Consumo e Produção Responsável, Ação Climática e Vida na Terra", o Brasil busca ferramentas para a produção mais eficiente de alimentos, incluindo a produção de proteína animal. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2022) reconheceu o Brasil como o detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 234,4 milhões de animais.

Considerando o sistema de produção de carne e a fase de cria, a importância no aumento da eficiência reprodutiva, aliado ao melhoramento genético dos produtos nascidos, fez com que a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se estabelecesse como uma ferramenta biotecnológica com aplicação crescente no mundo e especialmente no Brasil. A PIVE em bovinos, possibilita a multiplicação exponencial de fêmeas geneticamente superiores. Estabelecendo uma análise comparativa, fêmeas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo produzem um bezerro ao ano e até 10 bezerros ao longo de sua vida reprodutiva (LOIOLA *et al.*, 2014). Tal número pode ser grandemente ampliado com o uso intensivo da aspiração folicular guiada por ultrassonografia aliada à PIVE. A associação dessas biotécnicas utilizada intensivamente possibilita às fêmeas a contabilização do equivalente a um bezerro por semana, gerando assim um grande aumento no número de proles ao longo da vida produtiva e reprodutiva (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008; LOIOLA *et al.*, 2014). De acordo com Viana (2022), em 2021 foram produzidos no mundo 1.521.018 embriões bovinos pelo sistema *in vitro*, número 3,96 vezes maior que a produção *in vivo*, que foi de 386.374 no mesmo ano.

A PIVE envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fertilização *in vitro* dos oócitos (FIV) e cultivo *in vitro* dos embriões (CIV). As etapas de MIV e FIV são

realizadas com aceitável eficiência. Entretanto, sete dias após o início do CIV, a porcentagem de oócitos inicialmente cultivados que se desenvolvem até o estágio de blastocisto é de aproximadamente 40% (RIZOS *et al.*, 2008). Assim, torna-se de grande interesse o aperfeiçoamento da PIVE, para um maior êxito na taxa de conversão de oócitos em blastocistos após sete dias de cultivo.

A manipulação exercida sobre os oócitos e embriões na execução da PIVE, assim como as próprias condições do cultivo, reconhecidamente se associam para promover o estresse oxidativo (GUÉRIN *et al.*, 2001; SOTO-HERAS e PARAMIO, 2020). Tal estresse é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a remoção delas através de sistemas enzimáticos ou não. As EROs determinam danos celulares e favorecerem o desencadeamento dos mecanismos apoptóticos nas células (LI *et al.*, 2019). Níveis supra fisiológicos de EROs foram relacionados ao envelhecimento e aberrações cromossômicas em oócitos (LORD; MARTIN; AITKEN, 2015; MIHALAS *et al.*, 2017; SASAKI *et al.*, 2019).

A melatonina (N-acetilsalicílico-5-metoxitriptamina) é um hormônio com propriedades antioxidantes e reconhecidamente determina efeitos importantes na proteção dos tecidos ovarianos contra o estresse oxidativo (TAMURA *et al.*, 2012; MANCHESTER *et al.*, 2015; REITER *et al.*, 2016; RAI; GOSH, 2021), regulando a expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), ambas envolvidas na remoção de EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014a). Reportou-se que a melatonina, encontrada no fluído folicular, protege diretamente os oócitos das EROs (TATEMOTO *et al.*, 2004; FATEHI *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2012) e age inibindo a formação de EROs (TAMURA *et al.*, 2020). Observações recentes permitem sugerir que a melatonina favorece o desenvolvimento de oócitos e/ou embriões em diferentes espécies, como murinos (TIAN *et al.*, 2017b; KESHAVARZI *et al.*, 2018a; EZZATI *et al.*, 2018), ovinos (TIAN *et al.*, 2017a), bovinos (YANG *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; AN

et al., 2019; PANG *et al.*, 2019), suínos (LEE *et al.*, 2018; NIE *et al.*, 2018; WANG; ZENG, 2018) e caprinos (SAEEDABADI *et al.*, 2018).

Para a espécie bovina, a melatonina já foi testada na maturação oocitária e/ou cultivo embrionário. Cebrian-Serrano *et al.* (2013), em seu estudo, utilizaram a melatonina em ambas as etapas da PIVE. Nesse estudo, os autores investigaram a capacidade da melatonina atenuar efeitos nocivos do estresse térmico durante a PIVE que foi realizada a partir de ovários provenientes de abatedouro. O grupo genético dos animais utilizados não foi especificado no referido trabalho e, até o momento, não temos conhecimento de estudos com o uso de melatonina durante a PIVE com oócitos e embriões provenientes de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*).

O desenvolvimento embrionário inicial, *in vivo*, ocorre no oviduto sob influência de estímulos hormonais sistêmicos e locais, entre o embrião e epitélio tubário, onde o embrião modula localmente a expressão gênica, síntese de proteínas e atividade secretora das células tubárias, bem como sua velocidade de trânsito da tuba até a cavidade uterina (KÖLLE; HUGHES; STEELE, 2020). Na PIVE convencional, as etapas de MIV e CIV são realizadas em um sistema de cultivo bidimensional (2D), onde oócitos e embriões são cultivados em placas na presença de um meio de cultivo estabelecido, padecendo da ausência dos estímulos provenientes do tecido materno. No sistema 2D, parte do oócito ou embrião se adere na superfície da placa de cultivo ocasionando; na área em contato direto com a placa, a restrição de troca entre a estrutura e os componentes do meio de cultivo. Além disso, nos primeiros quatro dias de desenvolvimento *in vivo* dos embriões, o oviduto apresenta contrações musculares que determinam movimentos progressivos e retrógrados repetitivos do embrião no lúmen do oviduto. Tal movimentação é determinada por uma força mecânica que não é estabelecida nos cultivos *in vitro* (LI; WINUTHAYANON, 2017).

Frente a esse contexto, surge a necessidade de se buscar novas perspectivas que possam melhor mimetizar o ambiente fisiológico que envolve os oócitos e embriões, com a expectativa de contribuir para um aumento na produção e qualidade dos embriões produzidos. Dentro dessa proposta, uma

das alternativas pode ser o cultivo tridimensional (3D), que permite ao oócito e embrião estabelecer a área de troca nas suas três dimensões, ampliando a área de superfície de troca entre tais estruturas e os componentes do meio de cultivo. Relata-se que o ambiente 3D oferece um ambiente fisiologicamente mais similar ao microambiente uterino materno quando comparado ao 2D, com a possibilidade de exercer *in vitro*, a depender do material utilizado, força mecânica semelhante àquela exercida pela matriz extracelular *in vivo*, condição favorável ao desenvolvimento *in vitro* (WOODRUFF; SHEA, 2007).

Com base nessas informações, um novo tipo de membrana, denominada Cellfate® (Biocelltis Biotecnologia S.A, Brasil), constituída por biopolímeros naturais à base de nanocelulose bacteriana foi desenvolvida para o cultivo de diferentes tipos celulares. Até o momento, não foram realizadas pesquisas que avaliassem o emprego da membrana Cellfate® na PIVE e, considerando que o aperfeiçoamento das condições de cultivo de gametas e embriões bovinos se faz necessário diante do que foi exposto, esse trabalho foi desenvolvido para investigar os efeitos da utilização do referido sistema 3D. Além disso a utilização de melatonina durante a PIVE foi implementada. Essas modificações foram propostas com o objetivo de melhorar a taxa de sucesso da PIVE. O ineditismo do trabalho apresentado refere-se aos efeitos do cultivo 3D com membrana Cellfate® associado a melatonina, adicionada aos meios de cultivo de oócitos e embriões bovinos a partir de oócitos obtidos de fêmeas da raça Nelore, no desenvolvimento embrionário.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a PIVE em sistema 3D CellFate® associado com a melatonina na MIV, bem como a utilização do sistema 3D CellFate® isoladamente na MIV, resultam em melhor taxa de blastocisto geral no D9, sem alterar a expressão dos transcritos OCT4, GPX1, SOD2 e BAX em embriões bovinos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2022/01110-3), pelo auxílio financeiro ao referido projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOLÍN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SÁINZ, R. M.; MAYO, J. C.; URÍA, H.; KOTLER, M. L.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J.; TOLIVIA, D.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 882–890, 1996. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.10.8.8666165>>.

BAHADORI, M. H.; GHASEMIAN, F.; RAMEZANI, M.; ASGARI, Z. Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 11, 2013. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3941378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/241378/)>.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 497–502, 1995.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 267–278, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.20333>>.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M. A. Beneficial Effect of Melatonin on Blastocyst In Vitro Production from Heat-Stressed Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 738–746, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.12154>>.

CINTRA, L.; RECALDE, E. C.; SUDANO, M.; FRANCHI, F.; CASTILHO, A.; ALVARENGA, F. L. Effect of bovine endometrial mesenchymal cell conditioned medium on bovine embryo

development. **STUDIES IN ENVIRONMENTAL AND ANIMAL SCIENCES**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 131–148, 2022.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 267, p. 47–61, 2019.

DE AMORIM, J. D. P.; DE SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; DA SILVA DUARTE, I.; DE ASSIS SALES RIBEIRO, F.; SILVA, G. S.; DE FARIAS, P. M. A.; STINGL, A.; COSTA, A. F. S.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters** 2020 18:3, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-020-00989-9>>.

ELIS, S.; OSEIKRIA, M.; VITORINO CARVALHO, A.; BERTEVELLO, P. S.; CORBIN, E.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; LECARDONNEL, J.; ARCHILLA, C.; DURANTHON, V.; LABAS, V.; UZBEKOVA, S. Docosaheptaenoic acid mechanisms of action on the bovine oocyte-cumulus complex. **Journal of Ovarian Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5679375/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35679375/)>. Acesso em: 2 abr. 2024.

FATHI, M.; SALAMA, A.; EL-SHAHAT, K. H.; EL-SHERBINY, H. R.; ABDELNABY, E. A. Effect of melatonin supplementation during IVM of dromedary camel oocytes (*Camelus dromedarius*) on their maturation, fertilization, and developmental rates *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], v. 172, p. 187–192, 2021.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 175–189, 2001. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>>.

HE, C.; WANG, J.; ZHANG, Z.; YANG, M.; LI, Y.; TIAN, X.; MA, T.; TAO, J.; ZHU, K.; SONG, Y.; JI, P.; LIU, G. Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions. **International Journal of Molecular Sciences** **2016**, **Vol. 17**, **Page 939**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 939, 2016. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/939/htm>>.

HUGHES, C. K.; XIE, M. M.; MCCOSKI, S. R.; EALY, A. D. Activities for leptin in bovine trophoblast cells. **Domestic Animal Endocrinology**, [s. l.], v. 58, p. 84–89, 2017.

KÖLLE, S.; HUGHES, B.; STEELE, H. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 87, n. 6, p. 650–662, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrd.23352>>.

KOMNINO, E. R.; REMIÃO, M. H.; LUCAS, C. G.; DOMINGUES, W. B.; BASSO, A. C.; JORNADA, D. S.; DESCHAMPS, J. C.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BORDIGNON, V.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; GUTERRES, S. S.; COLLARES, T. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0157561, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0157561>>.

LI, C.; HE, X.; HUANG, Z.; HAN, L.; WU, X.; LI, L.; XIN, Y.; GE, J.; SHA, J.; YIN, Z.; WANG, Q. Melatonin ameliorates the advanced maternal age-associated meiotic defects in oocytes through the SIRT2-dependent H4K16 deacetylation pathway. **Aging**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1610–1623, 2020. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/article/102703>>.

LI, H. S.; ZHOU, Y. N.; LI, L.; LI, S. F.; LONG, D.; CHEN, X. L.; ZHANG, J. B.; FENG, L.; LI, Y. P. HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. **Redox biology**, [s. l.], v. 25, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30686776/>>.

- LI, Y.; ZHANG, Z. Z.; HE, C. J.; ZHU, K. F.; XU, Z. Y.; MA, T.; TAO, J. L.; LIU, G. S. Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 365–375, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12268>>.
- MARTÍNEZ ÁVILA, H.; FELDMANN, E. M.; PLEUMEEKERS, M. M.; NIMESKERN, L.; KUO, W.; DE JONG, W. C.; SCHWARZ, S.; MÜLLER, R.; HENDRIKS, J.; ROTTER, N.; VAN OSCH, G. J. V. M.; STOK, K. S.; GATENHOLM, P. Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold supports neocartilage formation *in vitro* and *in vivo*. **Biomaterials**, [s. l.], v. 44, p. 122–133, 2015.
- MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/PL00012498>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- MOU, Q.; YANG, Y. W.; CHEN, L.; FANG, T.; YAO, Y. C.; DU, Z. Q.; YANG, C. X. Melatonin mitigates Chloroquine-induced defects in porcine immature Sertoli cells. **Theriogenology**, [s. l.], v. 177, p. 1–10, 2022.
- NAGINA, G.; ASIMA, A.; NEMAT, U.; SHAMIM, A. Effect of melatonin on maturation capacity and fertilization of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Open Veterinary Journal**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 128–134, 2016. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/141633>>.
- POEGGELER, B.; REITER, R. J.; HARDELAND, R.; TAN, D. X.; BARLOW-WALDEN, L. R. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers *in vitro*. **Redox Report**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 179–184, 1996. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13510002.1996.11747046>>.
- REMIÃO, M. H.; LUCAS, C. G.; DOMINGUES, W. B.; SILVEIRA, T.; BARTHER, N. N.; KOMNINO, E. R.; BASSO, A. C.; JORNADA, D. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.;

JUNIOR, A. S. V.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; GUTERRES, S. S.; COLLARES, T. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 63, p. 70–81, 2016.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>>.

RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L.; COX, J.; TOVAR, H.; EINSPIANIER, R.; CASTRO, F. O. Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and *in vitro* produced embryos. **Zygote (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 269–279, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20429963/>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

RODRIGUES-CUNHA, M. C.; MESQUITA, L. G.; BRESSAN, F.; COLLADO, M. Del; BALIEIRO, J. C. C.; SCHWARZ, K. R. L.; DE CASTRO, F. C.; WATANABE, O. Y.; WATANABE, Y. F.; DE ALENCAR COELHO, L.; LEAL, C. L. V. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 1685–1694, 2016.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>>.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 104, p. 109963, 2019.

SHI, F.; QIU, J.; ZHANG, S.; ZHAO, X.; FENG, D.; FENG, X. Exogenous melatonin protects preimplantation embryo development from decabromodiphenyl ethane-induced circadian rhythm

disorder and endogenous melatonin reduction. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 292, p. 118445, 2022.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 132, p. 342–350, 2020.

SOTO-HERAS, S.; ROURA, M.; CATALÁ, M. G.; MENÉNDEZ-BLANCO, I.; IZQUIERDO, D.; FOULADI-NASHTA, A. A.; PARAMIO, M. T. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 253–261, 2018. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/rd/RD17170>>.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>>.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin and female reproduction. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jog.12177>>.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 28–42, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>>.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of Porcine Oocytes Against Cell Damage Caused by Oxidative Stress During *In vitro* Maturation: Role of

Superoxide Dismutase Activity in Porcine Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1150–1157, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.104.029264>>.

TIAN, X. Z.; WANG, F.; HE, C. J.; ZHANG, L.; TAN, D. X.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P. Y.; LIU, G. S. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 239–247, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12163>>.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12184808/>>.

VIANA, J. H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals . **Embryo Technology Newsletter**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 22–40, 2022.

WANG, F.; TIAN, X. Z.; ZHOU, Y. H.; TAN, D. X.; ZHU, S. E.; DAI, Y. P.; LIU, G. S. Melatonin Improves the Quality of *In vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e93641, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093641>>.

YANG, L.; WANG, Q.; CUI, M.; LI, Q.; MU, S.; ZHAO, Z. Effect of Melatonin on the In Vitro Maturation of Porcine Oocytes, Development of Parthenogenetically Activated Embryos, and Expression of Genes Related to the Oocyte Developmental Capability. **Animals 2020, Vol. 10, Page 209**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 209, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/2/209/htm>>.

YONG, W.; MA, H.; NA, M.; GAO, T.; ZHANG, Y.; HAO, L.; YU, H.; YANG, H.; DENG, X. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 144, p. 112001, 2021.

ZHU, T.; GUAN, S.; LV, D.; ZHAO, M.; YAN, L.; SHI, L.; JI, P.; ZHANG, L.; LIU, G.
Corrigendum: Melatonin Modulates Lipid Metabolism in Porcine Cumulus–Oocyte Complex via
Its Receptors (Front. Cell Dev. Biol., (2021), 9, 10.3389/fcell.2021.648209). **Frontiers in Cell and
Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 727612, 2021.